



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 : C07K 14/685, A61K 47/48		A2	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 96/41815</b>
			(43) Date de publication internationale: 27 décembre 1996 (27.12.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00890		(81) Etats désignés: AU, CA, IL, JP, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Date de dépôt international: 12 juin 1996 (12.06.96)			
(30) Données relatives à la priorité: 95/06909 12 juin 1995 (12.06.95) FR		Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera publiée dès réception de ce rapport.</i>	
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): INSTITUT EUROPÉEN DE BIOLOGIE CELLULAIRE [FR/FR]; 18, avenue de l'Europe, F-31520 Ramonville-Saint-Agne (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Néposants ( <i>US seulement</i> ): DUISOURD D'HINTERLAND, Lucie [FR/FR]; 10, rue Pierre-Benoit, F-31400 Toulouse (FR). PINEL, Anne-Marie [FR/FR]; 771, rue des Navigateurs, La Grande-Motte, F-34280 La Grande-Motte (FR).			
(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Régimeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).			
(54) Titre: CONJUGATES OF $\alpha$ MSH WITH A FATTY ACID, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND USE THEREOF AS A DRUG			
(54) Titre: CONJUGUES D' $\alpha$ MSH AVEC UN ACIDE GRAS, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET LEUR UTILISATION A TITRE DE MEDICAMENT			
(57) Abstract			
<p>A peptide conjugate comprising a peptide sequence that includes at least one sequence of four <math>\alpha</math>MSH-derived amino acids optionally in a natural form, said sequence being chemically or physically conjugated with acids selected from either dicarboxylic acids of general formula (I): HOOC-R1-COOH, wherein R1 is a straight or branched alkylene radical having at least 3 and preferably 3-10 carbon atoms, and being optionally substituted, in particular by one or more amino or hydroxy groups; or <math>\alpha</math>-monounsaturated fatty acids with a cis or preferably trans configuration of general formula (II): R2-CH-CH-COOH, wherein R2 is a straight or branched alkyl radical having at least 6 and preferably 6-10 carbon atoms, and being substituted by an amino, hydroxy or oxo group.</p>			
(57) Abrégé			
<p>L'invention concerne un conjugué peptidique, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence peptidique comprenant au moins une séquence de 4 acides aminés dérivés de l'<math>\alpha</math>MSH, les acides aminés étant sous forme naturelle ou non, ladite séquence étant conjuguée, chimiquement ou physiquement avec des acides sélectionnés parmi: les acides di-carboxyliques de formule générale (I): HOOC-R1-COOH, dans laquelle R1 représente un radical alkylène, linéaire ou ramifié, comprenant au moins 3 atomes de carbone, de préférence de 3 à 10 atomes de carbone, éventuellement substitué, notamment par un ou plusieurs groupes amino ou hydroxy, et les acides gras <math>\alpha</math>-monosaturés de configuration cis ou trans, de préférence trans, de formule générale (II): R2-CH-CH-COOH, dans laquelle R2 représente un radical alkyle, linéaire ou ramifié comprenant au moins 6 atomes de carbone, de préférence de 6 à 10 atomes de carbone, substitué par un groupe amino, hydroxy ou oxo.</p>			

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AU	Australie	GE	Géorgie	MX	Mexique
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BP	Bolivia Piso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Brésil	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brunell	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizstan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Soudan
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CN	Chine	LR	Liberia	SN	Sénégal
CS	Tchécoslovaquie	LT	Lithuanie	SZ	Swaziland
CZ	République tchèque	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne	LV	Lettone	TG	Togo
DK	Danemark	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
EE	Estonie	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
ES	Espagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
FI	Finlande	ML	Mali	UG	Ouganda
FR	France	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
GA	Gabon	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
				VN	Viet Nam

*CONJUGUES D'αMSH AVEC UN ACIDE GRAS, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET  
LEUR UTILISATION A TITRE DE MEDICAMENT*

La présente invention a pour objet la réalisation de dérivés peptidiques homologues de l'αMSH ou Mélanotropine, obtenus par synthèse 5 chimique, présentés sous forme de lipo-peptides.

L'αMSH et ses homologues ont fait l'objet de nombreuses publications, voire même d'essais thérapeutiques sans que cela se traduise par la réalisation d'un médicament. La raison principale est l'extrême ubiquité de l'αMSH en fonction des doses administrées et des voies d'administration.

10 De plus, l'absence de relation doses / effets (ce qui est le cas de nombreuses hormones peptidiques) complique sérieusement son utilisation thérapeutique. En effet, les récepteurs cellulaires de l'αMSH et de ses homologues sont du type G et la transduction intra-cellulaire s'effectue selon le cycle de l'AMP cyclique, l'activation de ces récepteurs cellulaires est 15 sensiblement inversement proportionnelle aux doses d'hormones peptidiques, acceptées par les structures du récepteur membranaire.

La présente invention repose sur la recherche de structures peptidiques spécifiquement orientées vers les activités anti-allergiques et anti-inflammatoires d'une part, et activatrices de la mélanogénèse d'autre 20 part à l'exclusion de tout autre effet pharmacologique notamment au niveau du système nerveux central, comme du système nerveux périphérique.

Plus particulièrement, la présente invention concerne un conjugué comportant une séquence peptidique comprenant au moins une séquence de 4 acides aminés dérivés de l'αMSH, les acides aminés étant sous 25 forme naturelle ou non, ladite séquence étant conjuguée, chimiquement ou physiquement avec des acides notamment dérivés d'acides à activités métaboliques connues, sélectionnés parmi :

- les acides dicarboxyliques de formule générale I



30 dans laquelle R1 représente un radical alkylène, linéaire ou ramifié, comprenant au moins 3 atomes de carbone de préférence ayant de 3 à 10 atomes de carbone, éventuellement substitué, notamment par un ou plusieurs groupes amino ou hydroxy, et

- les acides gras α-monoinsaturés de formule générale II

dans laquelle R2 représente un radical alkyle, linéaire ou ramifié compré-  
nant au moins 6 atomes de carbone, de préférence de 6 à 10 atomes de  
carbone éventuellement substitué par un groupe amino, hydroxy ou o xo,  
ces acides ayant la configuration cis ou trans, de préférence trans.

5 La séquence de l'αMSH est la suivante :

N-acétyl-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phé-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH<sub>2</sub>

Dans ce qui suit, lorsque l'on mentionne les séquences provenant  
de l'αMSH il faut entendre que les acides aminés peuvent être sous forme D, L,  
ou D,L ou bien sous les formes non naturelles des acides aminés correspon-  
dant à des dérivés, notamment substitués, halogénés par exemple.

10 Les peptides conjugués de bas poids moléculaire selon l'invention  
sont avantageusement liés sous forme de sels, d'esters ou d'amides, à des acides  
possédant des fonctions métaboliques essentielles dans l'activation du cycle  
tricarboxylique cellulaire tels qu'ils sont décrits précédemment.

15 Les acides de formules générales I ou II sont de préférence choisis  
parmi les diacides carboxyliques pour lesquels R1 représente un reste  
alkylène en C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>, substitué ou non, en particulier les acides adipiques, α-  
amino-adipiques et dérivés, l'acide sébacique et dérivés, les acides gras α-  
monoinsaturés pour lesquels R2 représente un reste alkyle, linéaire ou  
20 ramifié en C<sub>7</sub>, en particulier les acides hydroxydécenoïques, et décenoïques,  
sous forme des sels, esters, ou amides correspondants.

Il s'agit de préférence de l'acide adipique ou "acide hexanedioïque"  
(ADIP), de l'acide α-amino adipique (2-amino hexanedioïque), de l'acide  
sébacique ou acide décanedioïque, de l'acide trans - 10 - hydroxy - Δ<sup>2</sup> -  
25 décenoïque ou acide trans-hydroxy - 10 - décène - 2 - oïque (AH), et de l'acide  
trans-oxo - 9 - décène - 2 - oïque (9 - ADO).

Parmi ces acides, figurent préférentiellement pour des applica-  
tions en phase soluble dans l'eau, les acides adipiques et amino-adipiques.

30 Parmi les acides figurent les acides gras suivants plus particuliè-  
rement adaptés pour l'obtention de dérivés peptidiques liposolubles, l'acide  
sébacique et ses dérivés, l'acide oxo-décéné-oïque, et l'acide trans-hydroxy-  
décenoïque, définis précédemment, et dont les activités biologiques sont liées  
à leurs propriétés, anti-androgène, anti-séborrhéique et lipolytiques (Madéa  
et coll., Nippon, Hifuka - 98 (4) p. 469 - 1988).

Plus spécifiquement, la présente invention concerne des peptides activateurs de la mélano-génèse, anti-allergique et anti-inflammatoire.

La séquence de 4 acides aminés provenant de l'  $\alpha$ MSH, des conjugués selon l'invention, comprend de préférence au moins l'une des séquences peptidiques suivantes :

- Glu - His - Phé -
- His - Phé - Arg -
- Glu - His - Phé - Arg -

10 dans laquelle Phé représente la phénylalanine ou un dérivé halogéné de la phénylalanine, notamment D-homo-Phé et parafluoro-Phé les acides aminés pouvant être sous forme D, L, ou D,L.

D'une manière avantageuse, les conjugués selon l'invention répondent à la formule générale III :



15 dans laquelle

A est un acide de formules générales I ou II telles que définies ci-dessus, en particulier l'acide adipique, ou l'acide  $\alpha$ -amino adipique, l'acide sébacique, l'acide trans-oxo-9-décéne-2-oïque ou l'acide trans-hydroxy-10-décéne-2-oïque,

20 X représente un groupe 5-Me.Norleucine (Me.Nle), 2-N-Me-Norceuline (N-Me.Nle), OH ou NH<sub>2</sub>,

Y représente un reste Arg - Z ou Z dans lequel Z est Trp - Gly - OH, Trp - OH, OH, Trp - Gly - NH<sub>2</sub>, Trp - NH<sub>2</sub>, ou NH<sub>2</sub>,

25 Phé représente un reste D-Homo-Phé ou para-fluoro-Phé, les acides aminés étant sous forme D, L ou D,L.

La présente invention concerne particulièrement les dérivés peptidiques suivants :

- 1 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH<sub>2</sub>
- 2 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - NH<sub>2</sub>
- 30 3 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - NH<sub>2</sub>
- 4 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - NH<sub>2</sub>
- 5 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - NH<sub>2</sub>
- 6 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - NH<sub>2</sub>
- 7 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - NH<sub>2</sub>

8 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - NH<sub>2</sub>  
9 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH<sub>2</sub>  
10 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - NH<sub>2</sub>  
11 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - NH<sub>2</sub>  
12 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - NH<sub>2</sub>  
5 13 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - OH  
14 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - OH  
15 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - OH  
16 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - OH  
17 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - OH  
10 18 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - OH  
19 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - OH  
20 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - OH  
21 A - N - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - OH  
22 A - N - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - OH  
15 A étant défini ci-dessus, ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels d'esters ou d'amides.

Dans les conjugués 1 à 22 ci-dessus, la position de l'acide A correspond au dérivé ester ou amide, la fraction acide carboxylique de l'acide assurant la liaison.

20 Les séquences d'amino-acides mentionnées précédemment peuvent être des séquences d'amino-acides naturels ou des séquences d'amino-acides non naturels. De même dans certains cas il est possible que certains de ces amino-acides comportent des fonctions par exemple des glycosylations. Il doit être entendu que la présente invention concerne également l'ensemble de ces formes comprises par la présente description.

La présente invention concerne également des médicaments contenant un ou plusieurs des conjugués selon l'invention.

La présente invention concerne également l'utilisation de ces composés dans le domaine de la cosmétique.

30 La présente invention concerne également des compositions galéniques, pharmaceutiques, dermo-cosmétiques ou cosmétiques comprenant un composé tel que défini précédemment.

Ces compositions peuvent se présenter sous l'une des formes connues dans les domaines cosmétiques bien que les formes topique et 35 parentérale soient préférées.

Ces compositions sont utilisables aussi bien dans le domaine humain que vétérinaire.

Un des objets de la présente invention est l'application par voie topique et parentérale des conjugués peptidiques précédents. Les compositions pharmaceutiques peuvent être sous forme administrable par voie orale ou parentérale, injectable notamment, mais de préférence sous forme administrable par voie topique externe.

Ces compositions peuvent être notamment, sous forme de crème, spray, ou lotion par exemple et comporter des excipients connus et éventuellement d'autres principes actifs. Avantageusement, il s'agit de préparations dermo-cosmétologiques sous forme de solutions, de lotions d'émulsions, ou de crèmes utilisées comme accélérateur de bronzage de la peau, sans exposition aux U.V.

Les composés selon la présente invention sont utiles notamment dans la prévention et le traitement des allergies notamment cutanées, des réactions inflammatoires, et des troubles de mélanogénèse.

Les conjugués dont la séquence peptidique possède en position 4 l'amino-acide para-fluoro-Phé (dérivés peptidiques 5 à 8 et 18 à 22), sont particulièrement orientés vers une activité biologique anti-allergique et anti-inflammatoire, par effet suppresseur sur les médiateurs de l'inflammation et de l'allergie (IL1, IL6,  $\alpha$ TNF, PGE<sub>2</sub>), à l'exclusion d'une action sur la mélanogénèse.

Les conjugués dont les séquences en position 4 possèdent l'amino-acide D-homo-Phé (dérivés peptidiques 1 à 4 et 9 à 17), sont particulièrement orientés vers des activités de stimulation des processus de mélanogénèse, et possèdent également une activité anti-allergique et anti-inflammatoire.

Les séquences peptidiques selon la présente invention peuvent être obtenues par l'un des procédés quelconque connus de l'homme de métier, notamment par des procédés de synthèse chimique dans laquelle on peut intégrer les différents acides. En tout état de cause compte tenu de la faible dimension des peptides, la synthèse chimique est tout à fait possible et permet d'obtenir des produits très purs.

D'autres caractéristiques des conjugués selon l'invention apparaîtront à la lumière des exemples ci-après, qui illustrent également leur procédé de préparation par synthèse chimique.

Exemple 1 : Synthèse du conjugué 1 - A = Acide Adipique

Adipoyl - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH<sub>2</sub>.

La synthèse a été réalisée par la méthode de Merrifield en phase solide en utilisant une résine MBHA, et comme groupement protecteur FMOC 5 (fluoroéthyl méthoxy carbonyl).

Les dérivés d'acides aminés utilisés sont les suivants :

FMOC - Gly - OH,

FMOC - Trp - OH,

FMOC - Arg (Tos) - OH,

10 FMOC - D-homo-Phé - OH,

FMOC - His (Trt) - OH,

FMOC - Glu (chex) - OH, et

FMOC - Me.Nle - OH,

que l'on couple en utilisant le BOP comme agent de couplage.

15 Chaque acide aminé est utilisé en excès (x2) ainsi que le BOP (x2) et chaque couplage est répété 2 fois.

L'acide adipique est couplé de façon similaire, le groupement FMOC étant éliminé à chaque étape par la pipéridine (20 % dans le diméthylformamide). La déprotection finale est effectuée en deux étapes :

20 a) acide trifluoroacétique (2 fois x 5 minutes)

b) acide fluorhydrique anhydre / p-crésol 95,5 (45 minutes).

Le composé brut obtenu avec un rendement de 78 % est repris dans un mélange eau/acide acétique 95,5 % et est ensuite lyophilisé.

25 Le composé P1 obtenu a une pureté de 82 % (HPLC). 100 mg de ce composé sont ensuite purifiés par HPLC en utilisant une colonne C18 et on obtient 65 mg de produit pur.

Temps de rétention = 17,04 minutes dans les conditions suivantes :

- colonne C8 (250 mm x 5 mm), détection UV 210 nm

- solvant tampon phosphate Triéthylamine - acetonitrile 10 - 60 % en 15 minutes ; débit 1,4 ml / minute.

30 Analyse des acides aminés

Glu 1,02 - Gly 1,01 - His 1,00 - Arg 0,94 - D-homo-Phé 1,03 - (le Tryptophane n'a pas été déterminé car il se dégrade lors de l'hydrolyse acide).

Spectre de masse (FAB +) 1018,4 / 1126,5

Exemple 2 : Synthèse du conjugué 5 - A = Acide Adipique

En reprenant le mode opératoire de l'exemple 1 et en remplaçant FMOC-D-homo-Ph-OH par FMOC-para-fluoro-Phé-OH, on obtient le composé P2:

5 Adipoyl - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - NH<sub>2</sub>.

F = 120°C, décomposition. ( $\alpha$ )<sub>D</sub> - 7 (c = 0,4 DMF). HPLC : colonne C<sub>18</sub>, 5  $\mu$ m, débit 7 mL/min, détection 279 nm, solvant d'élution TFA 0,1 % / acétонitrile 77/23 v/v, temps de rétention 30,45 min. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm : Me.Nle (4,76, 1,62, 1,24, 0,82) ; Glu (8,54, 4,32, 1,86-1,72, 2,24) ; His (8,09, 4,53, 2,95-2,82) ; Para-Fluoro-Phé (8,09, 4,53, 3,00-2,78, 7,3-7,0) ; Arg (8,36, 4,29, 1,54-1,68, 1,45, 3,07) ; Trp (8,07, 4,53, 3,16-3,01, 10,80, 7,19, 7,56, 7,30, 6,96) ; Gly (8,18, 3,67-3,54).

Exemple 3 : Synthèse du conjugué 1 - A - Acide trans-10-hydroxy-2-décénoïque

En opérant comme dans l'exemple 1, en remplaçant l'acide adipique par l'acide trans-10-hydroxy-2-décénoïque, on obtient le composé P3 :

trans-10-hydroxy-2-décénoyle - Me.Nle - Glu - His - D-Homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH<sub>2</sub>.

20 F = 115°C, décomposition. ( $\alpha$ )<sub>D</sub> - 16 (c = 0,3 DMF). HPLC : colonne C<sub>18</sub>, 5  $\mu$ m, débit 7 mL/min, détection 279 nm, solvant d'élution TFA 0,1 % / acétонitrile 71/29 v/v, temps de rétention 24,20 min. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm : Ac (1,84) ; Me.Nle (8,00, 4,15, 1,59-1,48, 1,23, 0,83) ; Glu (8,00, 4,15, 1,86-1,72, 2,19) ; His (8,00, 4,54, 3,00-2,88, 8,89, 7,26) ; D-Homo-Phé (7,98, 4,53, 2,99-2,78, 7,3-7,0) ; Arg (8,27, 4,29, 1,67-1,53, 1,46, 3,08) ; Trp (8,07, 4,54, 3,16-3,01, 10,80, 7,16, 7,56, 7,30, 7,04, 6,96) ; Gly (8,19, 3,68-3,54).

Exemple 4 : Synthèse du conjugué 2 - A = Acide  $\alpha$ -Amino-Adipique

En opérant comme dans l'exemple 1, en remplaçant l'acide adipique par l'acide  $\alpha$ -amino-adipique, on obtient le composé P4 :

$\alpha$ -amino-adipoyl - Me.Nle - Glu - His - D-Homo-Phé - Arg - Trp - NH<sub>2</sub>.

F = 130°C, décomposition. ( $\alpha$ )<sub>D</sub> - 5 (c = 0,5 DMF). HPLC : colonne C<sub>18</sub>, 5  $\mu$ m, débit 7 mL/min, détection 279 nm, solvant d'élution TFA 0,1 % /

acétonitrile 77/23 v/v, temps de rétention 28,80 min.  $^1\text{H}$  RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm : Me.Nle (3,77, 1,62, 1,24, 0,82) ; Glu (8,53, 4,32, 1,82-1,71, 2,25) ; His (8,11, 4,53, 2,98-2,83) ; D-Homo-Phé (8,06, 4,47, 2,99-2,77, 7,25-7,1) ; Arg (8,32, 4,30, 1,69-1,55, 1,45, 3,07) ; Trp (8,02, 4,59, 3,16-3,00, 10,78, 7,15, 7,58, 7,30, 7,04, 6,96).

5

Exemple 5 : Synthèse du conjugué 3 - A = Acide Sébacique

En reprenant le mode opératoire de l'exemple 1, sans les réactifs FMOC - Gly - OH et FMOC - Trp - OH, en remplaçant l'acide adipique par l'acide sébacique, on obtient le composé P5 :

10 Sébaçoyle - Me.Nle - Glu - His - D-Homo-Phé - Arg - NH<sub>2</sub>.

$F = 130^\circ\text{C}$ , décomposition. ( $\alpha$ )<sub>D</sub> - 3,2 (c = 0,5 DMF). HPLC : colonne C<sub>18</sub>, 5  $\mu\text{m}$ , débit 7 mL/min, détection 279 nm, solvant d'élution TFA 0,1 % / acétonitrile 77/23 v/v, temps de rétention 21,86 min.  $^1\text{H}$  RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm : Me.Nle (4,70, 1,80, 2,30, 1,95) ; Glu (8,57, 4,30, 1,82-1,71, 2,25) ; His (8,21, 4,55, 2,98-2,83) ; Phé (8,09, 4,55, 2,99-2,77, 7,25-7,1) ; Arg (8,31, 4,30, 1,69-1,55, 1,45, 3,07) ; Trp (7,95, 4,61, 3,16-3,00, 10,78, 7,15, 7,58, 7,30, 7,04, 6,96) ; Gly (8,32, 3,75).

20 Exemple 6 : Etude de l'activité Anti-allergique des conjugués peptidiques, par le test d'Hypersensibilité de contact au Dinitrofluorobenzène (DNFB).

Matériel et méthode

Des souris femelles C57 BL/6JICO, âgées de 5 semaines sont réparties 25 en dix lots de dix animaux (cinq par cage), avec libre accès à l'eau et à la nourriture, soumises à une photopériode de douze heures de lumière par vingt-quatre heures.

Les animaux des lots 1 à 6 reçoivent quotidiennement et par application topique sur la peau rasée du dos, les produits à étudier (conjugués 30 1 et 5 représentés par les composés P1 et P2 préparés selon les exemples 1 et 2), mis en solution dans du propylène glycol, sous un volume constant de 50  $\mu\text{l}$  et cela pendant cinq jours consécutifs.

Posologie par souris et par jour

35 Composé P1 - Lots 1, 2 et 3 - 2,5  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$  et 0,1  $\mu\text{g}$  /souris/jour respectivement.

Composé P2 - Lots 4, 5 et 6 - 2,5 µg, 0,5 µg et 0,1 µg /souris/jour respectivement.

Les animaux du lot 10 servent de témoins (ils reçoivent seulement, 50 µl de propylène glycol par application topique pendant cinq jours).

Au cinquième jour, trente minutes après la dernière application toutes les souris sont sensibilisées avec 25 µl de D N F B (2,4-dinitro-1-fluorobenzène (FLUKA CHEMIKA PURUM à 97 % lot n° 33820890)) à 2 % dans un mélange 4 pour 1 d'acétone (SDS réf 0510) et de trioléine (FLUKA) appliquée par voie topique sur la région dorsale de peau rasée.

Au sixième jour, on procède à une nouvelle sensibilisation par application de D N F B.

Au onzième jour, l'épaisseur des oreilles des souris, est mesurée à l'aide d'un micromètre (ROCH 0 à 25 mm au 1/100 mm) afin d'obtenir des valeurs de base, puis les oreilles sont stimulées par application topique de 20 µl de D N F B à 0,8 %.

Au douzième jour, l'épaisseur des oreilles est à nouveau mesurée. On établit la valeur moyenne de l'épaississement des oreilles pour les souris des lots qui ont reçu les produits à étudier, ainsi que pour les souris du lot témoin.

Le pourcentage de suppression éventuelle sera exprimé par le calcul suivant :

$$\frac{T - E}{T} \times 100$$

avec T pour le pourcentage d'augmentation de l'épaisseur moyenne des oreilles du lot témoin et E pour celui des lots qui ont reçu les produits à étudier.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 1 ci-après.

TABLEAU 1

5	Conj.	Lot	% Augment. O. Gauche	% Augment. O. Droite	% Suppress. O. Gauche	% Suppress. O. Droite
	1	1	17,50	17,80	69,80	69,57
	1	2	19,00	19,50	67,24	66,66
	1	3	21,50	22,00	62,93	62,39
10	-	T	58	58,50	-	-
	5	4	17	16,65	70,48	71,39
	5	5	18,60	19,00	67,70	67,35
	5	6	20,80	21,50	63,88	63,05
15	-	T	57,60	58,20	-	-

T représente les Lots témoins pour chaque conjugué étudié.

Les conjugués 1 et 5 suppriment de façon hautement significative, de l'ordre de 69 % et 71 %, la réaction d'hypersensibilité cutanée induite 20 par administration de D N F B dans les conditions expérimentales décrites précédemment.

Exemple 7 : Etude de l'activité anti-inflammatoire des conjugués 1 et 5 (composés P1 et P2)

25

But de l'étude :

Mise en évidence de l'effet inhibiteur des conjugués 1 et 5 (composés P1 et P2) sur la production par des fibroblastes stimulés par l'IL 1, d'un métabolite de l'acide arachidonique, la PGE2.

30 Méthodes :

1 - Culture de fibroblastes pulmonaires embryonnaires d'origine humaine :

Nous avons choisi d'utiliser la souche ATCC MRC5 entretenue au laboratoire de façon continue et déjà testée par Cannon et al. (J. Immunol., 1986). Après un repiquage, les fibroblastes sont cultivés dans des micropuits 35 (plaqué de 24 trous de 2 cm<sup>2</sup>, Falcon). L'innoculum est de 30 000 cellules par trous ; le milieu nutritif utilisé est composé de RPMI 1640 (90 %) et de sérum

de veau foetal décomplémenté (SVF, 10 %). Le milieu est changé tous les deux jours jusqu'à confluence des cellules.

2 - Mise en expérience :

Les couches monocellulaires ainsi obtenues sont lavées puis 5 préincubées pendant 24 heures dans du milieu frais ne contenant que 1 % de SVF. Les substances à tester sont ajoutées au milieu à différentes concentrations comprises entre  $10^{-6}$  et  $10^{-4}$  M. Après 20 minutes d'incubation en présence de ces composés, l'IL1 recombinante humaine (Tebu, France) à la concentration de 5, 2,5 ou 0,5 ng/ml de milieu est mise en contact avec des 10 cellules pendant 18 heures. A la fin de cette incubation les surnageants sont prélevés et congelés à - 80 °C jusqu'à l'analyse. Les couches monocellulaires sont fixées au méthanol.

3 - Dosage de PGE2 :

Le dosage RIA est effectué selon la méthode décrite par Dray et al. 15 (Europ. J. Invest. 1975). 3 séries d'expériences en duplicate ont été réalisées pour chaque concentration de produit étudié et pour les contrôles. Les résultats sont exprimés en pg/µg d'ADN. L'effet inhibiteur est exprimé en pourcentage par rapport aux contrôles.

Afin d'éviter toute erreur possible due au comptage en microscopie 20 optique, l'ADN a été dosé par méthode fluorimétrique selon le protocole décrit par Brunk et al. (Analytical Biochem., 1979).

Les tableaux 2 et 3 ci-après rassemblent une première série d'essais sur la souche MRC5.

TABLEAU 2  
Action du Conjugué 1

	Concentration IL1 (ng)	Concentration Conjugué 1 (M)	PGE2 pg/mg d'ADN	% inhib.
5	2,5	0	389 ± 60	-
		10 <sup>-4</sup>	179 ± 50	53
		10 <sup>-5</sup>	232 ± 45	40
		10 <sup>-6</sup>	292 ± 68	24
		10 <sup>-7</sup>	364 ± 68	6
		10 <sup>-8</sup>	335 ± 50	13
		10 <sup>-9</sup>	320 ± 43	17
10	0,5	0	288 ± 25	-
		10 <sup>-4</sup>	113 ± 25	60
		10 <sup>-5</sup>	176 ± 37	38
		10 <sup>-6</sup>	231 ± 55	19
		10 <sup>-7</sup>	249 ± 60	13
		10 <sup>-8</sup>	258 ± 35	10
		10 <sup>-9</sup>	364 ± 56	-
20				

Les résultats montrent une bonne action inhibitrice du conjugué 1 avec un rapport effet dose. Cette action ne dépend pas de la concentration en IL1. On n'observe pas d'action à partir de 10<sup>-7</sup> M dans les deux cas.

TABLEAU 3  
Action du Conjugué 5

	Concentration IL1 (ng)	Concentration Conjugué 5 (M)	PGE2 pg/mg d'ADN	% inhib.
5	5	0	7576 ± 310	-
		10 <sup>-4</sup>	2964 ± 184	60
		10 <sup>-5</sup>	4580 ± 230	38
		10 <sup>-6</sup>	4900 ± 340	34
		10 <sup>-7</sup>	6150 ± 365	17
		10 <sup>-8</sup>	6142 ± 255	17
		10 <sup>-9</sup>	5047 ± 279	32

Les conjugués 1 et 5 possèdent un pouvoir inhibiteur de l'action de l'IL1 et de la PGE2. Très significative cette action pourrait être liée à un blocage des récepteurs.

Exemple 8 : Etude de l'action des conjugués 1 et 5 sur la mélanogénèse de la souris après l'application topique sous forme de crème dermique (Technique de Warren\*)

Matériel et méthode

1) Matériel

- Excipient dermique N° 66

25 Lano - vaseline - Ac,  
Huile de vaseline Pharmacopée,  
Cire d'abeille Ethoxyle,  
Lanoline purifiée,  
PEG - 200.

30 - Formules dermiques

Conjugués 1 et 5 (représentés par les composés P1 et P2) incorporés à raison de  $10 \times 10^{-5}$  M dans l'excipient dermique N° 66.

- Animaux

Souris DBA/2 IFFA - CREDO agées de 5 semaines.

35 2) Méthodes (Raphael WARREN PhD & coll. 0022-202, 1987, Society for Investigate Dermatology).

- On délimite sur chaque animal une tonsure dorsale après épilation.
- Les produits à essayer sont appliqués par massage à raison de 2 applications par jour, de 50 µl de chaque préparation pendant 5 jours.
- Deux jours après la dernière application, on sacrifice les animaux et on prélève des fractions de 50 mg environ de peau traitée.
- 5      • Chaque prélèvement est désséché par lyophilisation et pesé.
- Les fragments de peau sont ensuite soumis à une hydrolyse enzymatique par la protéase K pendant 72 heures à 45°C (Protéase K Merck - 24.568).
- 10     • On ajoute aux hydrolysats obtenus 500 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et 20 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 35 %.
- On met à incuber 30 minutes à 80°C.
- Après refroidissement on ajoute à chaque échantillon 200 µl de chloroforme / méthanol (2 vol/1 vol).
- 15     • On centrifuge à 10 000 g.
- On répartit la phase aqueuse (200 µl) dans les puits d'une microplaqué "NUNC".
- Dosage de la Mélanine
  - Le dosage de la mélanine s'effectue à 405 nm à l'aide d'un Multiskan - Titertek - MCC - 340, comparativement à une gamme étalon de mélanine Sigma M. 8631.
- Résultats
 

Ils sont exprimés en pourcentage de mélanine comparativement aux excipients considérés comme témoins.
- 20     I - Crème I - 5 10<sup>-5</sup> M de conjugué 1 pour 50 µl de crème.
- II - Crème 5 - 5 10<sup>-5</sup> M de conjugué 5 pour 50 µl de crème.
- III - Excipient 66 - comme témoin T.

Les moyennes des résultats sur 15 dosages sont reportés sur le Tableau 4 ci-dessous.

30

TABLEAU 4

Echantillon	% Mélanine / témoin
I	80 %
II	12 %
35      III	5 %

Le pourcentage de stimulation est calculé en fonction des valeurs QE et QT, avec QE pour la quantité moyenne de mélanine par mg de peau de l'échantillon testé et QT pour la quantité moyenne de mélanine par mg de peau du témoin, selon la formule

5

$$\% \text{ de stimulation} = \frac{\text{QE} - \text{QT}}{\text{QT}} \times 100$$

La crème dermique 1 administrée par voie topique, induit de façon hautement significative la synthèse de la Mélanine au niveau de l'épiderme 10 (+ 75 %). Cette activité conforme à l'objet de la présente invention est liée à la structure chimique du conjugué 1 qui contient le groupement D-homo-Phé.

Par contre, la crème dermique 5 administrée par voie topique, n'a pas d'activité sur la stimulation de la mélanogénèse épidermique, cette absence d'activité est liée à la présence dans le conjugué 5 du groupement 15 para-fluoro-Phé.

Ces résultats ont été confirmés par une étude sur la mélanogénèse selon la technique dite de "CLOUDMAN" par culture de mélanocytes in vitro, en utilisant les cellules du mélanome de CLOUDMAN chez le rat.

L'ensemble des résultats obtenus sont conformes à l'objet de la 20 présente invention dont l'objectif est la réalisation de conjugués actifs par voie topique et dont les activités anti allergiques et anti inflammatoires peuvent être séparées de l'activité sur la mélanogénèse selon les applications envisagées.

25 Exemple 9 : Etude comparative de l'activité des conjugués et de leurs structures peptidiques, sur l'hypersensibilité de contact au D N F B.

#### Matériel et méthode

30 La méthode utilisée est celle décrite précédemment dans l'exemple N° 4, hypersensibilité de contact induite chez la souris par la D N F B.

#### - Produits étudiés

Lot I : trans-10-hydroxy-2-décénoyl - Me-Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH<sub>2</sub>

35 - Conjugué 1 représenté par le composé P3.

Lot II : Me-Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH<sub>2</sub>

Lot T : Témoin = Acide trans-10-hydroxy-2-décénoïque.

Solvant : le propylène glycol précédemment employé comme témoin dans l'exemple 6.

Une mesure de l'activité du témoin sera effectuée pour chaque expérimentation.

5

- Expérimentation et posologie

	Lot I : Doses utilisées	Lot II : Doses utilisées
10	1 = 0,1 $\mu$ g/souris/jour	4 = 0,1 $\mu$ g/souris/jour
	2 = 0,5 $\mu$ g/souris/jour	5 = 0,5 $\mu$ g/souris/jour
	3 = 2,5 $\mu$ g/souris/jour	6 = 2,5 $\mu$ g/souris/jour

Témoin : 10 ng d'acide trans-10-hydroxy-2-décénoïque par souris et par jour.

15 Au cinquième jour, trente minutes après la dernière application toutes les souris sont sensibilisées avec 25  $\mu$ l de D N F B (2,4-dinitro-1-fluorobenzène (FLUKA CHEMICA PURUM à 97 % lot N° 33820890)) à 2 % dans un mélange 4 pour 1 d'acétone (SDS réf. 05510) et de trioléine (FLUKA) appliquée par voie topique sur la région dorsale de peau rasée. Au sixième jour, on procède à une nouvelle sensibilisation par application de D N F B. Au onzième jour, l'épaisseur des oreilles des souris, est mesurée à l'aide d'un micromètre (ROCH 0 à 25 mm au 1/100 mm) afin d'obtenir des valeurs de base, puis les oreilles sont stimulées par application topique de 20  $\mu$ l de D N F B à 0,8 %. Au douzième jour, l'épaisseur des oreilles est à nouveau mesurée. On établit la valeur moyenne de l'épaississement des oreilles pour les souris des lots qui ont reçu les produits à étudier, ainsi que pour les souris du lot témoin. Le pourcentage de suppression éventuelle sera exprimé par la même équation que dans l'exemple 6.

Les résultats sont reportés dans le Tableau 5 ci-après.

30

TABLEAU 5

5	Lot	Dose*	%	%	%	%
			Augment. O. Gauche	Augment. O. Droite	Suppress. O. Gauche	Suppress. O. Droite
	I	2,5	11,00	11,40	80,28	79,64
	I	0,5	13,00	12,90	76,70	76,96
	I	0,1	15,60	14,60	72,04	73,92
	T	0,01	55,80	56,00	-	-
10	II	2,5	17,60	18,50	69,17	67,82
	II	0,5	24,00	22,80	57,96	60,34
	II	0,1	32,00	30,20	43,95	47,47
	T	0,01	57,10	57,50	-	-

\* µg/souris/jour.

15 On observe 80 % de suppression de l'hypersensibilité cutanée à la dose de 2,5 µg/souris/jour pour le conjugué 1 (composé P3) selon l'invention, et une nette relation doses/effets entre les doses de 0,1, 0,5 et 2,5 µg/souris/jour. Par contre, pour le peptide seul, on observe 47 % de suppression de l'hypersensibilité cutanée à la dose de 0,1 µg/souris/jour et, pour les 20 doses de 0,5 µg et de 2,5 µg, la réponse suppressive est de l'ordre de 60 et 69 %. Enfin, on n'observe pas d'effet suppressif de l'hypersensibilité cutanée par administration de l'acide trans-10-hydroxy-2-décenoïque, en solution dans le propylène - glycol.

25 Administrés par voie topique et dans les conditions expérimentales décrites, le conjugué 1 selon l'invention induit de façon hautement significative la suppression de l'hypersensibilité cutanée chez la souris.

REVENDICATIONS

1 - Conjugué peptidique, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence peptidique comprenant au moins une séquence de 4 acides aminés dérivés de l'αMSH, les acides aminés étant sous forme naturelle ou non, ladite séquence étant conjuguée, chimiquement ou physiquement avec des acides sélectionnés parmi :

- les acides di-carboxyliques de formule générale I  
$$\text{HOOC - R1 - COOH (I)}$$
- 10 dans laquelle R1 représente un radical alkylène, linéaire ou ramifié, comprenant au moins 3 atomes de carbone, de préférence de 3 à 10 atomes de carbone, éventuellement substitué, notamment par un ou plusieurs groupes amino ou hydroxy, et
- les acides gras  $\alpha$ -monoinsaturés de configuration cis ou trans, de préférence trans, de formule générale II  
$$\text{R2 - CH = CH - COOH (II)}$$
- 15 dans laquelle R2 représente un radical alkylique, linéaire ou ramifié comprenant au moins 6 atomes de carbone, de préférence de 6 à 10 atomes de carbone, substitué par un groupe amino, hydroxy ou oxo.

20 2 - Conjugué selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence d'acides aminés est liée à l'acide sélectionné sous forme de sel, d'ester ou d'amide.

3 - Conjugué selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les acides de formules générales I ou II sont de préférence choisis parmi les diacides carboxyliques de formule I pour lesquels R1 représente un reste alkylène en  $\text{C}_4\text{-C}_8$ , substitué ou non, en particulier les acides  $\alpha$ -adipiques,  $\alpha$ -amino-adipiques et dérivés, l'acide sébacique et dérivés, les acides gras  $\alpha$ -monoinsaturés de formule II pour lesquels R2 représente un reste alkylique, linéaire ou ramifié en  $\text{C}_7$ , en particulier les acides hydroxydécenoïques, et décenoïques, sous forme des sels, esters, ou amides correspondants.

4 - Conjugué selon la revendication 3, caractérisé en ce que les acides de formules générales I ou II sont de préférence choisis parmi l'acide adipique, l'acide  $\alpha$ -amino adipique, l'acide sébacique, l'acide trans-10-hydroxy- $\Delta^2$ -décenoïque et l'acide trans-oxo-9-décéne-2-oïque.

35

5 - Conjugué selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence peptidique comporte au moins l'une des séquences suivantes :

5 - Glu - His - Phé -

- His - Phé - Arg -

- Glu - His - Phé - Arg -

dans laquelle Phé représente la phénylalanine ou un dérivé halogéné de la phénylalanine notamment D-homo-Phé et parafluoro-Phé, les acides aminés pouvant être sous forme D, L, ou D,L

10 6 - Conjugué selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il s'agit de conjugués de formule générale III :

A - X - Glu - His - Phé - Y (III)

dans laquelle

15 A est un acide de formules générales I ou II telles que définies dans les revendications 1, 3 et 4,

X représente un groupe 5-Me.Norleucine (Me.Nle), 2-N-Me.Norceuline (N-Me.Nle), OH ou NH<sub>2</sub>,

Y représente un reste Arg - Z ou Z dans lequel Z est Trp - Gly - OH, Trp - OH, OH, Trp - Gly - NH<sub>2</sub>, Trp - NH<sub>2</sub>, ou NH<sub>2</sub>,

20 Phé représente un reste D-Homo-Phé ou para-fluoro-Phé, les acides aminés étant sous forme D, L ou D,L

7 - Conjugué selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est sélectionné parmi les dérivés peptidiques suivants :

1 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH<sub>2</sub>

25 2 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - NH<sub>2</sub>

3 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - NH<sub>2</sub>

4 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - NH<sub>2</sub>

5 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - NH<sub>2</sub>

6 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - NH<sub>2</sub>

30 7 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - NH<sub>2</sub>

8 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - NH<sub>2</sub>

9 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH<sub>2</sub>

10 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - NH<sub>2</sub>

11 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - NH<sub>2</sub>

35 12 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - NH<sub>2</sub>

13 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - OH

14 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - OH

15        A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - OH  
16        A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - OH  
17        A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - OH  
18        A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - OH  
5        19        A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - OH  
20        A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - OH  
21        A - N - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - OH  
22        A - N - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - OH

A étant un acide de formules générales 1 ou II telles que définies dans les  
10 revendications 1, 3 et 4, ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de  
sels d'esters ou d'amides.

8 - A titre de médicaments, les conjugués selon l'une des revendications 1 à 7.

9 - Médicament selon la revendication 8, utile pour le traitement  
15 des allergies notamment cutanées, des réactions inflammatoires et des  
troubles de la mélanogénèse, utilisable en médecine humaine et vétérinaire.

10 - Composition galénique, caractérisée en ce qu'elle comprend un  
conjugué selon l'une des revendications 1 à 7.

11 - Composition galénique selon la revendication 10, caractérisée  
20 en ce qu'il s'agit de préparations dermo-cosmétologiques sous forme de  
solutions, de lotions d'émulsions, ou de crèmes utilisées comme accélérateur  
de bronzage de la peau, sans exposition aux U.V.

12 - Composition galénique selon l'une des revendications 10 ou 11,  
caractérisée en ce qu'il s'agit de préparations galéniques, sous forme de  
25 solutions, de lotions, de crème, de spray.